

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 537.312.54:[616.24-092.9:576.3]:57.085.1

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2026-23-1-19-28>

Поступила в редакцию 17.04.2025

Received 17.04.2025

А. Н. Шклярова¹, М. Н. Стародубцева²¹*Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь*²*Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Республика Беларусь***УПРУГИЕ СВОЙСТВА И КОЛЛАГЕН-СИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ ПОСЛЕ ВНЕШНЕГО ОБЛУЧЕНИЯ КРЫС
В ДОЗАХ 0,1–15 Гр**

Аннотация. Радиационный фиброз является одним из серьезных осложнений лучевой терапии, которое развивается в течение длительного времени после облучения. Молекулярно-клеточные механизмы, ведущие к развитию этой патологии, имеют место в значительно более ранние сроки. Ионизирующее излучение меняет свойства и функции фибробласта, являющегося основной клеткой соединительной ткани, продуцирующей белки внеклеточного матрикса. Целью исследования стало выявление с помощью методов атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии закономерностей радиационно-индуцированных изменений модуля упругости поверхности фибробластов легкого, уровня производства клетками коллагена и их взаимосвязи при облучении рентгеновским излучением области грудной клетки крыс и 3-недельного постлучевого периода. Установлено формирование зависимого от дозы облучения механического фенотипа фибробластов, обусловленного как изменением структуры актинового кортекса, так и формированием стрессовых волокон в зоне ядра клетки. Показано, что формирование радиационно-индуцированного механического фенотипа фибробластов коррелирует с их коллаген-синтетической активностью, что позволяет предположить внутренний механизм влияния механических свойств клетки в ядерной зоне на продукцию коллагена. Полученные данные углубляют понимание молекулярно-клеточных механизмов развития радиационного фиброза.

Ключевые слова: фибробласты легкого, крыса, рентгеновское излучение, модуль упругости, АСМ, коллаген, стрессовые волокна

Для цитирования: Шклярова, А. Н. Упругие свойства и коллаген-синтетическая активность фибробластов легких после внешнего облучения крыс в дозах 0,1–15 Гр / А. Н. Шклярова, М. Н. Стародубцева // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя медыцынскіх навук. – 2026. – Т. 23, № 1. – С. 19–28. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2026-23-1-19-28>

Nastassia N. Shkliarava¹, Maria N. Starodubtseva²¹*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus*²*Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus***ELASTIC PROPERTIES AND COLLAGEN-SYNTHESIZING ACTIVITY OF PULMONARY
FIBROBLASTS AFTER EXTERNAL IRRADIATION OF RATS AT DOSES OF 0.1–15 Gy**

Abstract. Radiation fibrosis is one of the serious complications of radiation therapy that develops over a long period after exposure. The molecular and cellular mechanisms leading to the development of this pathology take place at a much earlier time. Ionizing radiation changes the properties and functions of fibroblasts, the primary cells of connective tissue that produce extracellular matrix proteins. The study aimed to identify, using atomic force and fluorescence microscopy methods, patterns of radiation-induced changes in the elastic modulus of the pulmonary fibroblast surface, the level of collagen production by cells and their relationship following localized thoracic X-ray irradiation in rats and a 3-week post-exposure period. The formation of a dose-dependent mechanical phenotype of fibroblasts has been established, due to both changes in the structure of the actin cortex and the formation of stress fibers in the nuclear zones of cells. It has been shown that the formation of a radiation-induced mechanical phenotype of fibroblasts correlates with their collagen-synthetic ability, which suggests an internal mechanism of influence of the mechanical properties of cells in the nuclear zone on collagen production. The data obtained deepen the understanding of the molecular and cellular mechanisms of radiation fibrosis development.

Keywords: pulmonary fibroblasts, rat, X-rays, elastic modulus, AFM, collagen, stress fibers

For citation: Shkliarava N. N., Starodubtseva M. N. Elastic properties and collagen-synthesizing activity of pulmonary fibroblasts after external irradiation of rats at doses of 0.1–15 Gy. *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2026, vol. 23, no. 1, pp. 19–28 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2026-23-1-19-28>

Введение. Прогрессивное развитие методов медицинской визуализации с использованием ионизирующего излучения и их широкое применение в современной медицине увеличивает среднюю лучевую нагрузку на человека в течение его жизни. Повышение качества ранней диагностики онкологических заболеваний ведет к увеличению количества пациентов, которым требуется лучевая терапия. Ионизирующее излучение оказывает влияние на свойства и функции всех клеток облучаемого организма, в том числе и фибробластов – основных клеток соединительной ткани. Механические свойства фибробластов важны для осуществления многих клеточных процессов. В зависимости от поглощенной дозы ионизирующее излучение вызывает различные изменения параметров механических свойств клеток, что по-разному влияет на их функциональную активность. Ионизирующее излучение, в зависимости от дозы, может индуцировать преждевременное старение на клеточном, тканевом и организменном уровнях. В экспериментах *in vitro* на культуре фибробластов HFF (Human Foreskin Fibroblast) и MRC-5 (Human Fetal Lung Fibroblast) было установлено, что облучение молодых клеток рентгеновским излучением с дозой 2 Гр в течение суток вызывает изменения в экспрессии генов и сигнальных путях, сходные с процессами естественного старения, в отличие от воздействия более низких доз [1]. Облучение первичных культур фибробластов кожи крыс рентгеновским излучением с дозой 3–10 Гр вызывает повышение жесткости фибробластов, что свойственно стареющим клеткам [2, 3].

Крысы являются широко распространенной биологической моделью для изучения действия ионизирующего излучения на организм на разных уровнях его иерархии: системы, ткани и клетки. Как известно, организм крысы более радиорезистентен по сравнению с организмом человека. При самых общих оценках полулетальная доза LD₅₀ для крыс в 1,7 раза выше, чем доза для человека. Научный комитет ООН по воздействиям атомной радиации (UNSCEAR) определил дозу 0,1 Гр как максимальную для малых доз в отношении эффектов, наблюдаемых для человека. Для организма крысы соответствующую дозу можно отнести к малым. Поглощенная доза играет решающую роль в выборе механизмов реакции клеток на ионизирующее излучение: доза ионизирующего излучения 0,5–10 Гр вызывает старение, а более высокая доза >10 Гр – гибель клеток [4]. Помимо величины поглощенной дозы проявление действия ионизирующего излучения на организм зависит от срока, который прошел после облучения. Первые пострадиационные ответы клеток со временем вызывают общие ответы различных систем организма. В практике лучевой терапии лучевыми реакциями (без нарушения структуры и функционирования ткани) называют такие изменения в тканях, которые проходят в течение 2–4 недель после облучения [5]. Радиационный фиброз, патологический процесс, характеризующийся чрезмерным разрастанием соединительной ткани в результате активации и трансформации фибробластов в миофибробласты, обычно возникает через 4–12 месяцев после лучевой терапии и прогрессирует в течение нескольких лет [6]. При радиационном фиброзе увеличивается жесткость ткани и органа за счет увеличения вклада упругих волокон внеклеточного матрикса, при радиационном старении фибробластов, производящих молекулярные компоненты этих волокон, увеличивается жесткость клеток. Изучение взаимосвязи процессов, имеющих место на разных стадиях и разных иерархических уровнях, позволит углубить наши знания о механизмах развития радиационного фиброза легких для выработки новых стратегий его профилактики и терапии.

Существуют различные методы оценки механических свойств клеток, среди которых атомно-силовая микроскопия (АСМ) занимает особое положение. С помощью АСМ можно изучать структурные особенности поверхности клеток, а также тестировать их механические характеристики, пространственное распределение их по поверхности и вглубь клетки, что помогает лучше понять взаимосвязи механических и структурных свойств с функциональными свойствами и состоянием клеток.

Цель исследования – выявление закономерностей радиационно-индуцированных изменений модуля упругости поверхности фибробластов легкого, уровня производства клетками коллагена и их взаимосвязи при облучении рентгеновским излучением в широком диапазоне доз (0,1–15 Гр) области грудной клетки крыс и 3-недельного постлучевого периода.

Материалы и методы исследования. Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными

и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22.09.2010. На проведение исследования было получено одобрение комитета по этике Гомельского государственного медицинского университета (протокол № 2 от 24 марта 2021 г.). Самцы крыс линии Wistar содержались в стационарных условиях вивария Института радиобиологии НАН Беларуси, имели полноценный стандартный пищевой рацион и свободный доступ к воде, 12/12-часовой режим освещения и темноты согласно установленным нормам. На момент облучения возраст животных составлял 14 месяцев.

Однократное облучение области грудной клетки самцов крыс линии Wistar рентгеновским излучением проводили в дозах 0,1 Гр (3 крысы), 1 Гр (4 крысы) и 15 Гр (4 крысы) с использованием рентгеновского аппарата биологического назначения X-RAD320 (Precision X-Ray Inc., США) ($U = 50$ кВ, $I = 12,5$ мА, $P = 2,57$ сГр/мин, фильтр № 1 (2 мм Al), расстояние до объекта – 50 см). Нижнюю половину туловища и голову экранировали свинцовыми защитными пластинками. Выведение животных из эксперимента проводили на 21-е сутки после облучения. Контрольную группу представляли 3 крысы, содержащиеся в тех же условиях, что и остальные, исключая облучение. Долю легкого промывали дважды в растворе Хэнкса (Gibco, США), затем измельчали ножницами и помещали в эппендорф объемом 2 мл, содержащий 0,1%-й раствор коллагеназы (30 мин, 37 °С) с последующей отмывкой в растворе Хэнкса. Ферментативное расщепление проходило с использованием 0,25%-го раствора трипсина при температуре 37 °С с последующим центрифугированием [7]. После этого образцы легкого помещали в 6-луночный планшет вместе со средой DMEM/F-12 (Capricorn Scientific, Германия) с добавлением 10%-й сыворотки (Gibco, США) и 1%-го раствора антибиотик-антимикотика (Capricorn Scientific, Германия) до полного выхода клеток. Пересадка культур проводилась дважды в неделю при 80 % конфлюентности. Всего в работе было использовано 14 первичных культур фибробластов легкого крысы на этапе 2-го пассажа. За день до эксперимента клетки в количестве 20 тыс. высаживались в чашки Петри с адгезионной поверхностью (Sarstedt, Германия).

Для иммунофлуоресценции клетки фиксировали с помощью 3,7%-го раствора формальдегида 10 мин при комнатной температуре, а затем двукратно отмывали фосфатно-солевым буфером. Для пермеабилзации в течение 5 мин применяли 0,1%-й раствор Triton (Carl Roth, Германия) и дважды отмывали фосфатно-солевым буфером. Для окраски коллагена использовали антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 647 (Abcam, Великобритания) (1 : 100) с инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре и с последующей отмывкой в фосфатно-солевом растворе 2 раза. Для окраски F-актина клетки инкубировали с фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Phalloidin-iFluor™ 488 Conjugate (Cayman Chemical, США) (1 : 50), в течение 1 ч при комнатной температуре с отмывкой фосфатно-солевым раствором 2 раза и 1 раз дистиллированной водой. Ядра клеток окрашивали монтирующей средой с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (Fluoromount-G, с DAPI, Invitrogen, США). Флуоресцентные изображения получали с помощью инвертированного светового микроскопа Axio Observer 3 (Zeiss, Германия) со светодиодным источником света Colibri 7 с записью изображений в программе Zen Blue с 40-кратным увеличением объектива ($\lambda_{ex} = 353$ нм и $\lambda_{em} = 465$ нм для DAPI; $\lambda_{ex} = 493$ нм и $\lambda_{em} = 517$ нм для AF488; $\lambda_{ex} = 653$ нм и $\lambda_{em} = 668$ нм для AF647). Флуоресцентные изображения были проанализированы с помощью программного обеспечения Fiji v.2.0.0-rc-49/1.51a путем выбора одной клетки за раз на изображении и измерения площади, интегрированной плотности и среднего значения серого. Данные представляли как результат расчета скорректированной общей флуоресценции клеток: $CTCF = \text{интегрированная плотность} - (\text{площадь выбранной клетки} \times \text{средняя флуоресценция фоновых показаний})$.

Для проведения АСМ клетки за день до эксперимента высаживали в чашки Петри с адгезионной поверхностью (Sarstedt, Германия) в количестве 20 тыс. Перед сканированием их промывали фосфатно-солевым буферным раствором, сканировали клеточные образцы в растворе Хэнкса. Сканирование образцов в жидкой среде проводили с помощью АСМ BioScope Resolve (Bruker, США) в режиме MIROview PeakForce QNM in Fluid или Force Volume иглой-зондом NSG03 (TipsNano, NT-MDT, Эстония), изготовленной из кремния (резонансная частота – 90 кГц, жесткость консоли – 1,74 Н/м). Кантилевер покрыт Au для увеличения сигнала лазера.

Запись малых участков поверхности клеток над ядром размером $15 \times 15 \text{ мкм}^2$ проводили с разрешением 20×20 пикселей. Структурные и механические свойства клеток оценивали по полученным АСМ-изображениям, используя программу Nanoscope Analysis v.1.8.

Статистическую обработку данных и построение графиков осуществляли с помощью программы OriginPro v.2019b и статистического онлайн-калькулятора Statistics Kingdom (Мельбурн, Австралия). При статистическом анализе данных использовали тест Шапиро – Уилка – на нормальность; U -критерий Манна – Уитни – для сравнения средних двух выборок; критерий Краскелла – Уоллиса с post hoc анализом с поправкой Бонферрони – Данна или критерий ANOVA с post hoc анализом с критерием Тьюки – для сравнения средних нескольких выборок.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены типичные АСМ-изображения клеток первичных культур фибробластов, полученных из легкого крыс после их облучения и 3-недель-

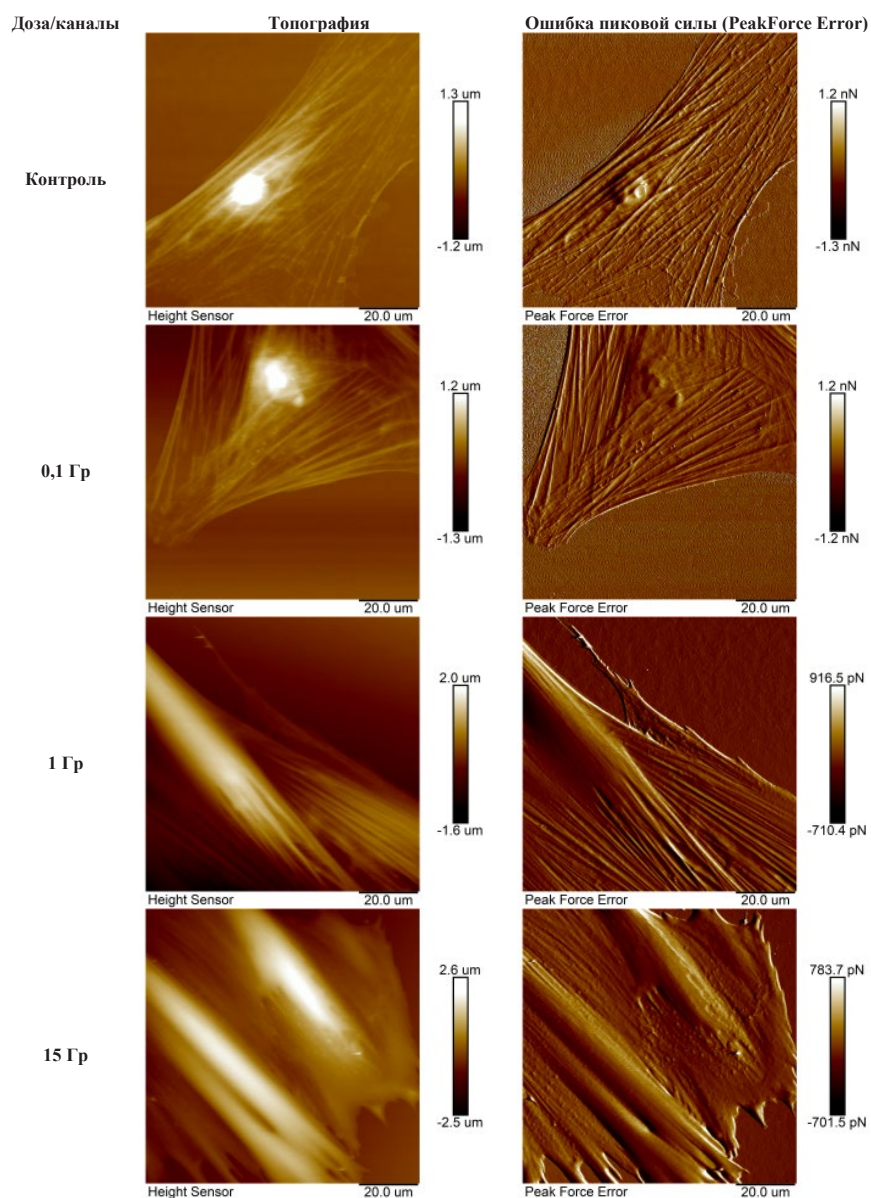


Рис. 1. АСМ-изображения первичной культуры фибробластов легкого (каналов топографии и ошибки пиковой силы) в зависимости от дозы ионизирующего излучения *in vivo*. Режим сканирования – PeakForce QNM. Размер области сканирования – $94,7 \times 94,7 \text{ мкм}^2$, разрешение – 512×512 пикселей

Fig. 1. AFM images of the primary culture of pulmonary fibroblasts (Height and PeakForce Error channels) depending on the dose of ionizing radiation *in vivo*. Peak Force QNM Mode. The size of the scanning area is $94.7 \times 94.7 \text{ }\mu\text{m}^2$, the resolution is 512×512 pixels

ного постлучевого периода, в зависимости от поглощенной дозы. Фибробласты облученных животных имеют зависимые от дозы морфологические особенности. Для фибробластов контрольной группы характерен четкий рисунок стрессовых фибрилл, направленных в основном вдоль оси поляризации клетки, и снижение их плотности в области ядра клетки. После облучения в малой дозе (0,1 Гр) описанные выше морфологические черты фибробластов сохраняются. Для больших доз (1 и 15 Гр) явно увеличена высота клеток за счет образования крупных жестких объединений стрессовых волокон, направленных вдоль оси поляризации клетки. Для дозы 15 Гр на АСМ-изображениях дополнительно визуализируются множественные мелкие гранулы на поверхности клеток, лучше заметные на картах ошибки пиковой силы (рис. 1).

В дальнейших экспериментах мы изучали механические свойства поверхности фибробластов разных групп в области над ядром с помощью режима сканирования Force Volume. Размеры области сканирования были выбраны как 15×15 мкм² с разрешением 20×20 пикселей, что дало размер единичной ячейки тестируемой поверхности 750×750 нм². Длина стрессовых волокон обычно составляет несколько десятков микрон, а их поперечное сечение – до 1 мкм [8]. Следовательно, выбранные в работе параметры сканирования позволяют различить распределение стрессовых волокон в поверхностном слое клеток.

При оценке методом АСМ параметров механических свойств поверхности фибробластов необлученных и облученных крыс выявлено значительное ослабление упругих свойств поверхностного слоя фибробластов после облучения верхней части животных внешним рентгеновским излучением в дозах 0,1 и 1 Гр в сравнении с необлученным контролем. Модуль упругости поверхности живых клеток контрольной группы составил $E = 7,52 \pm 0,32$ кПа (95 % ДИ). Статистический анализ полученных данных показал существенное ослабление упругих свойств поверхности клеток после облучения как в дозе 0,1 Гр ($E = 6,69 \pm 0,20$ кПа (95 % ДИ)), так и в дозе 1 Гр ($E = 6,86 \pm 0,44$ кПа (95 % ДИ)) ($p = 0,0313$, критерий ANOVA, критерий Тьюки). Наблюдаемый эффект ослабления упругих свойств при дозе 1 Гр и ниже отличается от результатов оценки влияния рентгеновского излучения *in vitro* на модуль упругости фибробластов из кожи крыс [2]. При облучении *in vitro* (1–10 Гр) ослабления упругих свойств поверхности фибробластов, оцениваемых с использованием фиксированных и высушенных образцов клеток, не установлено, имело место только увеличение значения модуля упругости [2]. В представленном здесь исследовании постепенное увеличение среднего значения модуля упругости поверхности ядерной области наблюдалось с повышением дозы от 0,1 до 15 Гр (рис. 2, а). При облучении крыс в дозе 15 Гр модуль упругости составил $E = 7,61$ (6,75; 9,02) кПа (Me (LQ; UQ)).

На рис. 2, а видно, что для образца 15 Гр имеет место увеличение степени неоднородности значений модуля упругости, проявляющееся в увеличении вклада высоких значений модуля (увеличение части синего прямоугольника над медианным значением). Более глубокий анализ данных показывает, что медианные значения модуля можно связать с упругими свойствами клеточного кортекса, содержащего в основном актиновый цитоскелет, а увеличенные значения модуля упругости в распределении модуля для образца 15 Гр можно связать с появлением в зоне ядра стрессовых волокон, обладающих высокими упругими свойствами.

В связи с выявленным по АСМ-изображениям целых фибробластов формированием стрессовых волокон области ядра нами был проведен анализ распределения значений модуля упругости участка поверхности фибробласта в ядерной области в зависимости от расстояния от самой высокой точки области сканирования (и клетки в целом). На рис. 2, b, d, f представлены АСМ-изображения поверхности фибробластов в ядерной области, полученные в режиме Force Volume, а на рис. 2, c – схема условного разделения трехмерной поверхности клетки в области сканирования на несколько зон в зависимости от удаления (параметр d) от самой высокой точки клетки в районе ядра. На рис. 2, e приведены зависимости значений модуля упругости от параметра d для фибробластов первичных культур животных, облученных в разных дозах. В ядерной зоне модуль упругости повышается с увеличением дозы от 0,1 до 15 Гр. При дозе 15 Гр наблюдается резкий скачок повышения модуля упругости поверхности фибробластов в самом высоком месте – непосредственно над ядром. Однако, как показывают топографические изображения участков поверхности фибробластов крыс, облученных в дозе 15 Гр, наиболее выступающими обла-

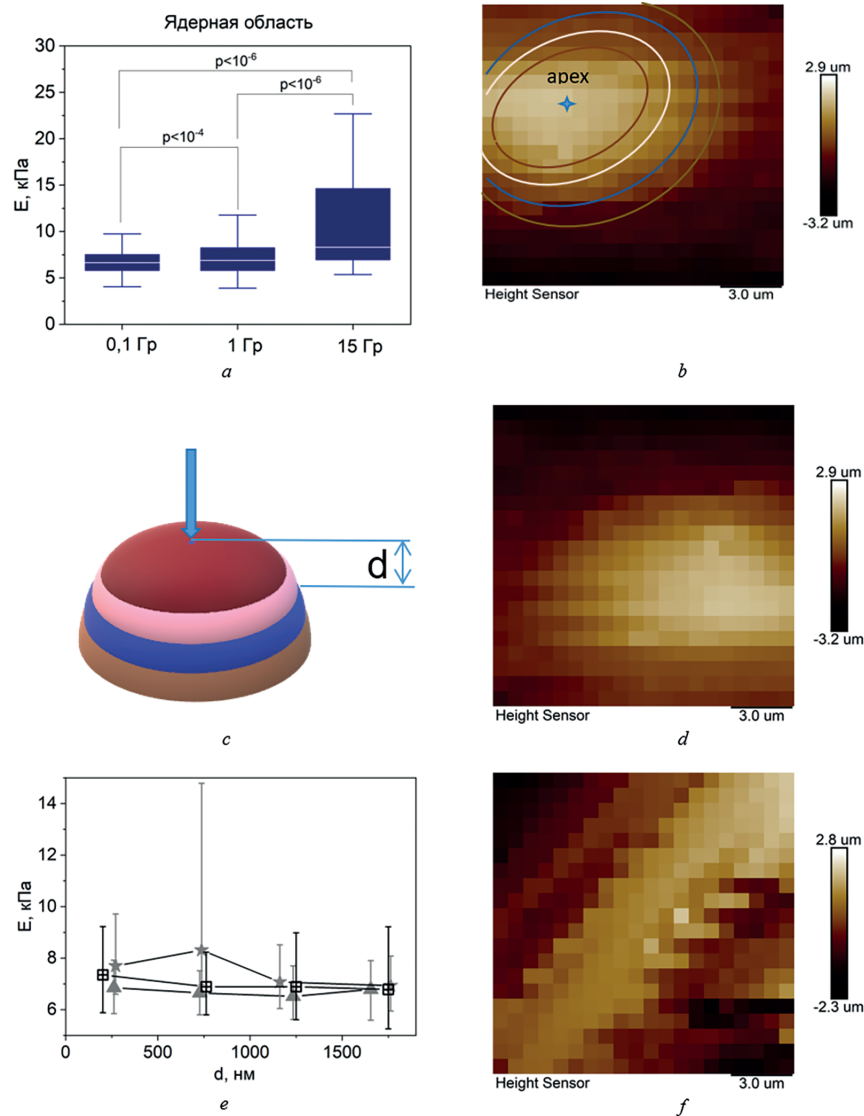


Рис. 2. Влияние локального облучения крыс рентгеновским излучением на механические свойства поверхности фибробластов первичных культур, выделенных из легкого: *a* – зависимость модуля упругости участков поверхности фибробластов над ядром от дозы облучения (данные представлены как медиана, нижний, верхний квартили, минимальные и максимальные значения. Критерий Краскелла – Уоллиса, множественные сравнения с поправкой Бонферрони – Данна); *b* – топографическое АСМ-изображение участка поверхности фибробласта контрольного образца (4-конечной звездой указана наивысшая по высоте точка участка поверхности фибробласта, окружностями представлены условные уровни, равноудаленные от вершины); *c* – схематическое представление участка поверхности клетки в зоне над ядром с высшей точкой и слоями, равноудаленными от вершины толщиной *d*; *d* – топографическое АСМ-изображение участка поверхности фибробласта первичной культуры, выделенной из легкого крысы, облученной в дозе 1 Гр; *e* – модуль упругости поверхности фибробластов в зависимости от удаления от вершины изучаемого участка поверхности (*d*) и дозы облучения крыс (треугольниками, квадратами и звездочками представлены данные для доз 0,1; 1 и 15 Гр соответственно); *f* – топографическое АСМ-изображение участка поверхности фибробласта первичной культуры, выделенной из легкого крысы, облученной в дозе 15 Гр

Fig. 2. Effect of local X-ray irradiation of rats on the mechanical properties of the surface of fibroblasts of primary cultures isolated from lung: *a* – dependence of the elastic modulus of the fibroblast surface area above the nucleus on the absorbed dose (data are presented as median, lower, upper quartiles, minimum and maximum values. The Kruskal – Wallis criterion and multiple comparisons with the Bonferroni – Dunn correction are used); *b* – topographic AFM image of the fibroblast surface area of the control sample (the four-pointed star indicates the highest point (apex) on the fibroblast surface, the circumferences represent the conditional levels equidistant from the apex); *c* – schematic representation of the cell surface area in the zone above the nucleus with the apex and layers equidistant from the apex with a thickness of *d*; *d* – topographic AFM image of the fibroblast surface area of the primary culture isolated from the lung of a rat irradiated at a dose of 1 Gy; *e* – the elastic modulus of the fibroblast surface depending on the distance from the apex of the studied surface area (*d*) and the absorbed dose (triangles, squares, and asterisks represent data for doses of 0.1, 1 and 15 Gy, respectively); *f* – topographic AFM image of the fibroblast surface area of the primary culture isolated from the lung of a rat irradiated at a dose of 15 Gy

стями клеток являются области над выраженными стрессовыми волокнами (рис. 2, *f*). Повышение жесткости поверхности клеток, сопровождающееся сборкой в клетках структур стрессовых волокон, может свидетельствовать о трансформации фибробластов в миофибробласты, которые и характеризуются повышенной экспрессией α -актина гладкомышечных клеток [9].

В работе мы также изучили производство клетками первичных культур фибробластов, изолированных из необлученных и облученных крыс, коллагена, одного из основных белков внеклеточного матрикса соединительной ткани. На рис. 3 представлены изображения флуоресцентной микроскопии с использованием красителей для выявления пространственного распределения белков коллагена и филаментного актина в фибробластах первичных культур из необлученных и облученных крыс.

Продукция коллагена была существенно повышена в фибробластах первичных культур, выделенных из легкого крыс, облученных в дозах 1 и 15 Гр в сравнении с контрольными фибробластами (рис. 4, *a*). Анализ количества филаментного актина в фибробластах облученных животных показал резкое увеличение степени полимеризации актина в фибробластах при дозе 15 Гр (рис. 4, *b*).

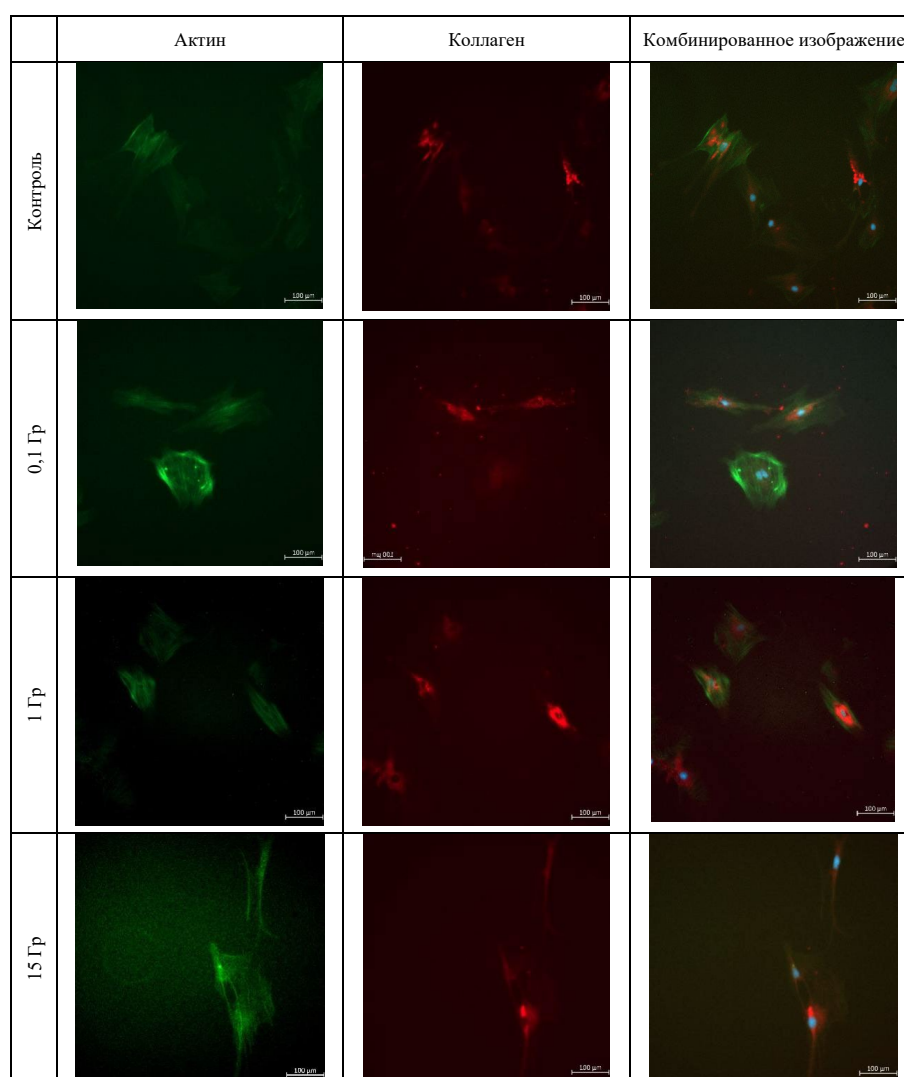


Рис. 3. Флуоресцентные изображения клеток фибробластов легкого с использованием красителей Alexa Fluor 488 Phalloidin (зеленый), Alexa Fluor 647 Collagen I типа (красный) и DAPI (голубой) в зависимости от дозы ионизирующего излучения. Размер изображения – $665,60 \times 665,60 \text{ мкм}^2$, разрешение – $2\,048 \times 2\,048$ пикселей. Время экспозиции Alexa Fluor 488 Phalloidin – 240 мс, Alexa Fluor 647 Collagen I типа – 1,2 с, DAPI – 500 мс

Fig. 3. Fluorescent images of pulmonary fibroblasts using the dyes Alexa Fluor 488 Phalloidin (green), Alexa Fluor 647 Collagen Type I (red) and DAPI (blue) depending on the dose of ionizing radiation. The image size is $665.60 \times 665.60 \text{ }\mu\text{m}^2$, the resolution is $2\,048 \times 2\,048$ pixels. The exposure time was 240 ms for Alexa Fluor 488 Phalloidin, 1.2 s for Alexa Fluor 647 Collagen I Type – 500 ms for DAPI

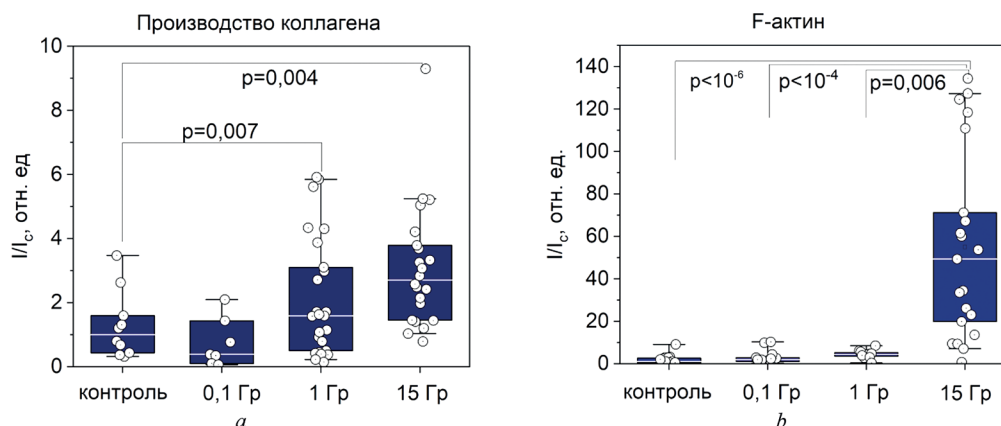


Рис. 4. Зависимость параметров производства коллагена (а) и полимеризации актина (b) в фибробластах первичных культур из легкого необлученных и облученных крыс. Данные представлены как Me (LQ; UQ) и 5–95 % перцентили. Критерий Краскелла – Уоллиса с post hoc анализом с поправкой Бонферрони – Данна

Fig. 4. Dependence of the parameters of collagen production (a) and actin polymerization (b) in fibroblasts of primary cultures from the lungs of non-irradiated and irradiated rats. The data is presented as Me (LQ; UQ) and 5–95 % percentiles. Kruskal – Wallis test with post hoc analysis with Bonferroni – Dunn test

При этом прослеживается положительная корреляционная связь между степенью полимеризации актина и дозой облучения (рис. 4, b; $R = 0,49$; коэффициент корреляции Спирмана, $p < 0,05$). Общая оценка средних значений произведенного клетками коллагена для крыс, облученных в дозах 0,1 и 1 Гр, не выявила существенных различий между ними. Однако данные для крыс после облучения в дозе 1 Гр сильно неоднородны и могут говорить о наличии двух субпопуляций клеток с разным уровнем производства коллагена – с высокой и низкой скоростью производства (рис. 4, a).

Таким образом, полимеризация актина в фибробластах в первичных культурах, выделенных из легкого крыс на 21-е сутки после облучения животных, и формирование стрессовых волокон коррелируют с повышением продукции клетками коллагена, что свидетельствует о трансформации фибробластов в миофибробласты. При этом время 50%-й выживаемости крыс после облучения верхней части туловища рентгеновским излучением в дозе 15 Гр по кривой выживаемости составляло почти 59 сут. Следовательно, наблюдаемые изменения свойств фибробластов имеют место в организме крыс в ранний период развития радиационных осложнений.

Радиационно-индуцированные изменения жесткости фибробластов, связанные с реорганизацией в них структур цитоскелета, формируют особый механический фенотип фибробластов, определяемый дозой облучения организма и постлучевым периодом, который передается дочерним клеткам при пролиферации клеток в первичной культуре. Фибробласты синтезируют белки внеклеточного матрикса, а также растворимые медиаторы, такие как цитокины, факторы роста и метаболиты. С изменением механического фенотипа фибробластов после облучения организма ионизирующим излучением скорость производства этих молекул меняется. Механизмы этого изменения сложны, но они, определенно, включают изменения механических свойств компонентов клетки и внеклеточного матрикса. Более всего известно влияние на синтетическую активность клеток изменения жесткости внеклеточного матрикса. Физические сигналы об изменении жесткости внеклеточного матрикса воспринимаются рецепторами на поверхности клетки и далее передаются внутриклеточно, запуская внутриклеточные сигнальные пути, ведущие к изменениям на уровнях транскрипции и посттранскрипции и изменениям клеточного метаболизма и поведения. Например, повышение жесткости внеклеточного матрикса при увеличенном производстве коллагена и эластина фибробластами нарушает гомеостаз внеклеточного микроокружения, что активирует механочувствительные пути клеточной сигнализации, повышающие уровни профибротических цитокинов и, следовательно, аномально активированных фибробластов с усиленной выработкой коллагеновых волокон. При этом возникает положительная обратная связь: «фиброз–повышение жесткости внеклеточного матрикса–активация фибробластов–усиление фиброза» [10]. Этот цикл обуславливает постоянство и необратимость фиброза, что усложняет задачу по предотвращению прогрессирования этой патологии [11]. В последнее время

интерес исследователей направлен также на влияние механических свойств ядра и окружения синтетических систем клетки на эффективность процессов синтеза и внутриклеточного транспорта синтезируемых клеткой молекул [12, 13]. Предполагается, что существует физическая связь между ядерным скелетом и цитоскелетом (актиновыми микрофиламентами, микротрубочками и промежуточными филаментами) [14]. Каждый из этапов синтеза и транспортировки проколлагена в клетке зависит от механических свойств клеточных элементов, вовлеченных в эти процессы. Следовательно, вероятен и внутренний механизм контроля коллаген-синтетической способности фибробластов, основанный на влиянии механических свойств ядерной области клеток на синтетическую способность фибробластов. Усиление упругих свойств области ядра способствует повышению эффективности синтеза и секреции проколлагена радиационно-измененными фибробластами, что повышает жесткость внеклеточного матрикса и запускает описанный выше цикл с положительной обратной связью, ведущий к фиброзу. Следовательно, терапевтические методы против радиационно-индуцированного фиброза могут быть направлены на недопущение повышения жесткости клеточного кортекса и формирования стрессовых волокон или на разрушение стрессовых волокон в фибробластах.

Заключение. С использованием биологической модели и методов АСМ установлено, что после облучения *in vivo* рентгеновским излучением и 3-недельного постлучевого периода имеет место формирование нового зависимого от дозы механического фенотипа фибробластов, обусловленного как изменением структуры актинового кортекса, так и формированием стрессовых волокон в зоне ядра клетки. Показано, что формирование радиационно-индуцированного механического фенотипа фибробластов коррелирует с их коллаген-синтетической активностью, что позволяет предположить внутренний механизм влияния механических свойств клетки в ядерной зоне на продукцию коллагена. Полученные данные углубляют понимание молекулярно-клеточных механизмов развития радиационного фиброза.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарны Е. А. Медведевой и А. Е. Сусленковой за помощь в экспериментах с животными. Работа выполнена в рамках задания «Разработать критерии оценки радиационно-индуцированных изменений ткани внутренней среды, основанной на анализе структуры и механических свойств клеточного компонента на моделях *in vitro* и *in vivo*» «Природные ресурсы и окружающая среда 3.01» ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда», подпрограмма 3 «Радиация и биологические системы» на 2021–2025 гг. (№ ГР 20210231).

Acknowledgements. The authors are grateful to E. A. Medvedeva and A. E. Suslenkova for their help in experiments with animals. The work was performed within the framework of the assignment “To develop criteria for assessing radiation-induced changes in the tissue of the internal environment based on the analysis of the structure and mechanical properties of the cellular component in *in vitro* and *in vivo* models” “Natural Resources and the environment 3.01” of the State Scientific Research Program “Natural Resources and the Environment”, subprogram 3 “Radiation and biological systems” on 2021–2025 (No. GR 20210231).

Список использованных источников

1. Replicative and radiation-induced aging: a comparison of gene expression profiles / A. M. Aliper, M. E. Bozdaganyan, P. S. Orekhov [et al.] // *Aging*. – 2019. – Vol. 11, N 8. – P. 2378–2387. <https://doi.org/10.18632/aging.101921>
2. Влияние рентгеновского излучения на структурные и механические свойства поверхностного слоя фибробластов крыс / И. А. Челнокова, А. Н. Шклярова, Т. Д. Матвеевкова, М. Н. Стародубцева // *Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гомель, 10 нояб. 2023 г.: в 3 т.* / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: И. О. Стома [и др.]. – Гомель, 2023. – Т. 2. – С. 118–122.
3. Starodubtseva, M. N. Mechanical properties of cells and ageing / M. N. Starodubtseva // *Ageing Research Reviews*. – 2011. – Vol. 10, N 1. – P. 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.10.005>
4. Extracellular matrix stiffness –The central cue for skin fibrosis / K. Wang, D. Wen, X. Xu [et al.] // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2023. – Vol. 10. – Art. 1132353. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1132353>
5. Галченко, Л. И. Лучевые осложнения при лучевой терапии: учеб. пособие для студентов / Л. И. Галченко, В. В. Маточкин. – Иркутск: Иркут. гос. мед. ун-т, 2015. – 30 с.
6. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy / J. F. Straub, L. New, C. D. Hamilton [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 141, N 11. – P. 1985–1994. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-1974-6>
7. Fuentes-Mateos, R. Optimized Protocol for Isolation and Culture of Murine Neonatal Primary Lung Fibroblasts / R. Fuentes-Mateos, E. Santos, A. Fernandez-Medarde // *Methods and Protocols*. – 2023. – Vol. 6, N 1. – Art. 14. <https://doi.org/10.3390/mps6010014>

8. Deguchi, S. Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells / S. Deguchi, M. Sato // *Biorheology*. – 2009. – Vol. 46, N 2. – P. 93–105. <https://doi.org/10.3233/bir-2009-0528>
9. Unraveling SSc pathophysiology; The myofibroblast / A. van Caam, M. Vonk, F. van den Hoogen [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – Art. 2452. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02452>
10. Mechanical communication in fibrosis progression / Y. Long, Y. Niu, K. Liang, Y. Du // *Trends in Cell Biology*. – 2022. – Vol. 32, N 1. – P. 70–90. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.10.002>
11. Fisher, T. Effect of nuclear stiffness on cell mechanics and migration of human breast cancer cells / T. Fisher, A. Hayn, C. T. Mierke // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – Art. 393. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00393>
12. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation / J. Swift, I. L. Ivanovska, A. Buxboim [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 341, N 6149. – Art. 1240104. <https://doi.org/10.1126/science.1240104>
13. Nuclear Stiffness Decreases with Disruption of the Extracellular Matrix in Living Tissues / K. P. McCreery, X. Xu, A. K. Scott [et al.] // *Small*. – 2021. – Vol. 17, N 6. – Art. e2006699. <https://doi.org/10.1002/sml.202006699>
14. Dahl, K. N. Nuclear Shape, Mechanics, and Mechanotransduction / K. N. Dahl, A. J. S. Ribeiro, J. Lammerding // *Circulation Research*. – 2008. – Vol. 102, N 11. – P. 1307–1318. <https://doi.org/10.1161/circresaha.108.173989>

References

1. Aliper A. M., Bozdaganyan M. E., Orekhov P. S., Zhavoronkov A., Osipov A. N. Replicative and radiation-induced aging: a comparison of gene expression profiles. *Aging*, 2019, vol. 11, no. 8, pp. 2378–2387. <https://doi.org/10.18632/aging.101921>
2. Chelnokova I. A., Shklyarova A. N., Matveenkova T. D., Starodubtseva M. N. The effect of X-ray radiation on the structural and mechanical properties of the surface layer of rat fibroblasts. *Aktual'nye problemy meditsiny: sbornik nauchnykh statei Respublikanskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhduнародnym uchastiem (Gomel', 10 noyabrya 2023 goda). Tom 2* [Current Problems of Medicine: A Collection of Scientific Articles from the Republican Scientific and Practical Conference with International Participation (Gomel, November 10, 2023). Vol. 2]. Gomel, 2023, vol. 2, pp. 118–122 (in Russian).
3. Starodubtseva M. N. Mechanical properties of cells and ageing. *Ageing Research Reviews*. 2011, vol. 10, no. 1, pp. 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.10.005>
4. Wang K., Wen D., Xu X., Zhao R., Jiang F., Yuan S., Zhang Y., Gao Y., Li Q. Extracellular matrix stiffness – The central cue for skin fibrosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2023, vol. 10, art. 1132353. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1132353>
5. Galchenko L. I., Matochkin V. V. *Radiation complications during radiation therapy: a textbook for students*. Irkutsk, Irkutsk State Medical University, 2015. 30 p. (in Russian).
6. Straub J. F., New L., Hamilton C. D., Lominska C., Shnyder Y., Thomas S. M. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2015, vol. 141, no. 11, pp. 1985–1994. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-1974-6>
7. Fuentes-Mateos R., Santos E., Fernandez-Medarde A. Optimized Protocol for Isolation and Culture of Murine Neonatal Primary Lung Fibroblasts. *Methods and Protocols*, 2023, vol. 6, no. 1, art. 14. <https://doi.org/10.3390/mps6010014>
8. Deguchi S., Sato M. Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells. *Biorheology*, 2009, vol. 46, no. 2, pp. 93–105. <https://doi.org/10.3233/bir-2009-0528>
9. Van Caam A., Vonk M., van den Hoogen F., van Lent P., van der Kraan P. Unraveling SSc pathophysiology; The myofibroblast. *Frontiers in Immunology*, 2018, vol. 9, art. 2452. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02452>
10. Long Y., Niu Y., Liang K., Du Y. Mechanical communication in fibrosis progression. *Trends in Cell Biology*, 2022, vol. 32, no. 1, pp. 70–90. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.10.002>
11. Fisher T., Hayn A., Mierke C. T. Effect of nuclear stiffness on cell mechanics and migration of human breast cancer cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, vol. 8, art. 393. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00393>
12. Swift J., Ivanovska I. L., Buxboim A., Harada T., Dingal P. C. D. P., Pinter J., Pajeroski J. D., Splinter K. R., Shin J.-W., Tewari M., Rehfeldt F., Speicher D. W., Discher D. E. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science*, 2013, vol. 341, no. 6149, art. 1240104. <https://doi.org/10.1126/science.1240104>
13. McCreery K. P., Xu X., Scott A. K., Fajrial A. K., Calve S., Ding X., Neu C. P. Nuclear Stiffness Decreases with Disruption of the Extracellular Matrix in Living Tissues. *Small*, 2021, vol. 17, no. 6, art. e2006699. <https://doi.org/10.1002/sml.202006699>
14. Dahl K. N., Ribeiro A. J. S., Lammerding J. Nuclear Shape, Mechanics, and Mechanotransduction. *Circulation Research*, 2008, vol. 102, no. 11, pp. 1307–1318. <https://doi.org/10.1161/circresaha.108.173989>

Информация об авторах

Шклярва Анастасия Николаевна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: anshklyarava@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-6365-3856>

Стародубцева Мария Николаевна – д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры медицинской и биологической физики. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: maria.n.starodubtseva@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-6956-9014>

Information about the authors

Nastassia M. Shklyarava – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: anshklyarava@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-6365-3856>

Maria N. Starodubtseva – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Professor of the Department of Medical and Biological Physics. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: maria.n.starodubtseva@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-6956-9014>